

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年1月18日 (18.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/04301 A1(51) 国際特許分類7: C12N 15/12, 5/10, 1/15, 1/19, 1/21,
C12P 21/02, C07K 14/47, 16/18, C12Q 1/02, 1/68[MASUHO, Yasuhiko] [JP/JP]; 〒184-0011 東京都小金
井市東町5-19-15 Tokyo (JP). 本田紀夫 [OTA, Toshio]
[JP/JP]; 〒251-0042 神奈川県藤沢市辻堂新町1-2-7-105
Kanagawa (JP). 磯貝隆夫 [ISOGAI, Takao] [JP/JP]; 〒
300-0303 茨城県稻敷郡阿見町大室511-12 Ibaraki (JP).
西川哲夫 [NISHIKAWA, Tetsuo] [JP/JP]; 〒173-0013
東京都板橋区氷川町27-3-403 Tokyo (JP). 河合弓利
(KAWAI, Yuri) [JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢
那4508-19-201 Chiba (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04549

(22) 国際出願日: 2000年7月7日 (07.07.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/194179 1999年7月8日 (08.07.1999) JP
60/159,586 1999年10月18日 (18.10.1999) US
特願2000/128993 2000年4月25日 (25.04.2000) JP(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヘリックス研究所 (HELIX RESEARCH INSTITUTE)
[JP/JP]; 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番地3
Chiba (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 森川記行
(MORIKAWA, Noriyuki) [JP/JP]; 〒292-0833 千葉
県木更津市貝渕3-9-17-408 Chiba (JP). 増保安彦(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki (JP).(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT,
RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

[統葉有]

(54) Title: FATTY ACID TRANSPORTER PROTEIN AND GENE ENCODING THE PROTEIN

(54) 発明の名称: 脂肪酸輸送タンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子

(57) Abstract: PSEC67 is cloned from a human full length cDNA library. A protein encoded by this gene is confirmed as being a fatty acid transporter protein (FATP) having an activity of incorporating oleic acid. This protein is useful as a target molecule of preventives or remedies for various diseases (cardiomyopathy, skeleton muscle disorder, renal failure, etc.) in association with metabolic errors of long-chain fatty acids.

(57) 要約:

全長ヒト cDNA ライブライマーから、PSEC67 がクローニングされた。この遺伝子
がコードするタンパク質は、オレイン酸の取り込み活性を持つ脂肪酸輸送タンパ
ク質 (FATP) であることが確認された。本発明のタンパク質は、長鎖脂肪酸の代謝
異常に伴う種々の疾患（心筋症、骨格筋障害、腎障害等）に対する、予防もしく
は治療薬の標的分子として有用である。

WO 01/04301 A1



LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

添付公開類:
— 国際調査報告

明細書

脂肪酸輸送タンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子

技術分野

本発明は、脂肪酸輸送活性を有するタンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子に関する。

背景技術

生体内でオレイン酸等の長鎖脂肪酸は細胞膜の合成、細胞内情報伝達、タンパク質の修飾、転写調節など細胞の営みに必要なエネルギー源として重要な役割を果たしている。まず食餌中の脂質は臍臓リバーゼにより脂肪酸とグリセロールに分解され(Chapus C. Biochimie 70: 1223-1234, 1998)、そのうち脂肪酸は再エステル化されてリンパ系システムに移動する(Green P. H. and Aust. N. Z. J. Med. 11: 84-90, 1981)。遊離脂肪酸はまた一方で脂肪組織においてトリアシルグリセロールの分解により生じる。このようにして生成された遊離脂肪酸は循環系では血清アルブミンと結合した状態で存在して脂肪細胞、肝細胞、心臓平滑筋細胞などに取り込まれ、それら細胞内のミトコンドリアなどで β -酸化されることにより長鎖脂肪酸の最大 90%がエネルギー源となる。

長鎖脂肪酸が小腸、肝細胞、心筋細胞、脂肪細胞において選択的に取り込まれていることはこれまでによく知られていたが、それらが細胞内に取り込まれる際に膜を輸送する分子メカニズムは議論のあるところであった。そしていくつかのタンパク質が長鎖脂肪酸の輸送に関わる候補として挙げられた(Ockner R. K. and Kane J. P. J. Biol. Chem. 257: 7872-7878, 1982)。そのうちのひとつが、1994 年に Lodish らにより単離・クローニングされた Fatty Acid Transport Protein (FATP) である。

FATP はマウス脂肪細胞から expression cloning strategy により単離された 63kDa の plasma membrane protein である。これを持続的に発現させた動物細胞は長鎖脂肪酸の取り込みを選択的に上昇させた (Shaffer J. E. and Lodish H. F. Cell 79: 427-436, 1994)。その後の研究によりこのタンパク質にはいくつかのホモログが存在することが示され、マウスについて FATP-1, 2, 3, 4, 5 がクローニングされた。そのうち完全長のものとして活性が確認されたものは FATP-1, -2, -5 であり、FATP-3, 4 は完全長でないため活性は確認されていない (Hirsch. D. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 8625-8629, 1998)。

FATP は長鎖脂肪酸の代謝経路のうち重要なステップの一つである、細胞内への輸送に関わる膜タンパク質である。これまでに長鎖脂肪酸の代謝異常により、心筋症、骨格筋障害、代謝性疾患、腎障害、神経系機能障害、突然死等の臨床例が報告されている (Kelly. D. P. and Strauss A. W. N. Eng. J. Med. 330: 913-919, 1994; Saudubray J. M. In New Developments in Fatty Acid Oxidation, P. M. Coates and K. Tanaka eds., New York: Wiley-Liss) ことから、この膜タンパク質の機能不全によりこれらの疾患への関与が推測される。

特に糖尿病ではインスリン欠乏により遊離脂肪酸が上昇し、これが病態誘発の一因ともなっている。実際に糖尿病患者の血漿中の遊離脂肪酸濃度は、健常人の食後の約 4 倍、飢餓時の約 3 倍にまで上昇することが知られている。細胞レベルでも FATP の発現がインシュリンや PPAR γ による制御を受けることが報告されている (Martin G. J. Biol. Chem. 272: 28210-28217, 1997)。血漿中の遊離脂肪酸を代謝促進すること、つまり FATP の作用を増強することでこの現象を軽減させることが期待される。

また過剰の脂肪の蓄積が肥満の原因になっていることから、FATP の作用を促進することは脂肪分解を促進することにもなるので、肥満の治療効果も期待される。またその一方でこの膜タンパク質は体の広い範囲に分布し、小腸への分布もみられること、そして食餌中の脂肪酸の取り込みにも直接関わることから、例え

ば小腸における FATP の作用を特異的に抑制することで肥満の軽減効果も考えられる(Andreas Stahl, Molecular Cell, 4, 299-308, 1999)。さらに動物の個体レベルで敗血症モデルである LPS 投与モデルラットで FATP が誘導される(Memon R. A. Am. J. Physiol. 274 (2 Pt 1), E210-217, 1998)ことから、FATP の作用を抑制することにより敗血症をはじめとする炎症性疾患の治療も期待できる。

また、FATP ファミリーは一次構造上、ATP 結合領域、および C 末側に保存された領域を有するが、これらの領域はアシル CoA 合成酵素(Acyl-CoA synthetase)でも保存されている。従って FATP ファミリーは Acyl-CoA synthetase 活性をも有することが期待される。これまでにマウス FATP-1 が同活性を有することは報告されている(Natalie Ribarik Coe, J.B.C., 274, 36300-36304, 1999)。

このように FATP ファミリーは長鎖脂肪酸の輸送とともに代謝にも関与していることが推察される。従ってこの蛋白の活性を維持することは脂肪酸の輸送とともに代謝を維持することになり、脂肪酸の代謝異常に起因する疾患（心筋症、骨格筋障害、代謝性疾患、腎障害、神経性機能障害、突然死）の改善が期待される。

さらに、一般にヒト膜タンパク質には、Tissue plasminogen activator (TPA) のように、そのものが医薬品として有用なものや、膜レセプターのように医薬品の標的タンパク質になりうるものが多い。

このように新規な膜タンパク質、特に脂肪酸の輸送や代謝に関与する膜タンパク質を提供することは、非常に大きな意義がある。

発明の開示

本発明は、脂肪酸輸送活性を有する膜タンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子、並びにそれらの製造方法及び用途を提供することを課題とする。

上記のように、膜タンパク質、特に長鎖脂肪酸の細胞への取り込みに関与する膜タンパク質、および該取り込みを制御する化合物は、長鎖脂肪酸の代謝異常に伴う疾患の治療薬として期待される。

そこで本発明者らは、上記の課題を解決するために、新規なヒト遺伝子のクローニングを目的として、下記の如く鋭意研究を行った。まず、オリゴキャップ法 (Maruyama K. and Sugano S. Gene 138: 171-174, 1994; Suzuki Y. et al. Gene 200: 149-156, 1997) で作製した全長率の高いヒト cDNA ライブラリーを構成するクローンを単離した。次いで、この方法で取得した全長率の高い cDNA クローンの塩基配列を 5' 側と 3' 側の両側から決定した。そして、ATGpr (Salamov A. A. et al. Bioinformatics 14: 384-390, 1998; <http://www.hri.co.jp/atgpr/>) 等で全長 cDNA クローンであると予想されるヒト全長 cDNA を選択した。こうして得られたヒト全長 cDNA クローンの塩基配列を利用し、PSORT (Nakai K and Kanehisa M. Genomics 14: 897-911, 1992) でシグナル配列を持つと予想されるクローンを特異的に選別し、膜タンパク質をコードする cDNA を有すると予想されるクローンを取得した。該クローンの全長 cDNA 配列を解析し、その塩基配列がコードするアミノ酸配列を推定した。そして推定アミノ酸配列に基づいて、BLAST (Altschul S. F. et al. J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990; Gish W. and States D. J. Nature Genet. 3: 266-272, 1993; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) により、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Genbank/index.html>) や SwissProt (http://www.ebi.ac.uk/ebi_docs/swissprot_db/swisshome.html) を利用して相同性解析を行った。

こうした解析を通じて、本発明者らは全長 cDNA クローンの 1 つである PSEC0067 (以下、「PSEC67」とも表記する) に注目した。このクローンは、マウス Fatty Acid Transport Protein-3 (FATP-3) と塩基レベルで 83% (図 6～図 8) 、そしてアミノ酸レベルで 83% (図 9) のホモロジーを有する新規なタンパク質をコードしていた。更に本発明者らは、PSEC67 によってコードされるタンパク質が、実際に長鎖脂肪酸を取り込む作用を持つことを実験的に明らかにした。そして、このタンパク質の活性を制御することにより、長鎖脂肪酸の代謝に関する疾患の予防や治療が可能となることを見出し本発明を完成させた。すなわち本発明は、

以下の新規な膜タンパク質、およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

[1] 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：1 に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2 に記載に記載されたアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号：1 に記載された塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

[2] [1] に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[3] [1]、または[2] に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

[4] [1]、または[2] に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

[5] [1]、もしくは[2] に記載のポリヌクレオチド、または[4] に記載のベクターを保持する形質転換体。

[6] [5] に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、
[3] に記載の蛋白質の製造方法。

[7] [3] に記載の蛋白質に対する抗体。

〔8〕 〔7〕に記載の抗体と、〔3〕に記載の蛋白質との免疫学的反応を検出する工程を含む、〔3〕に記載の蛋白質の免疫学的測定方法。

〔9〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドのいずれか、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド。

〔10〕 〔9〕に記載のポリヌクレオチドからなる、〔1〕に記載のポリヌクレオチド合成用プライマー。

〔11〕 〔9〕に記載のポリヌクレオチドからなる、〔1〕に記載のポリヌクレオチドの検出用プローブ。

〔12〕 〔1〕に記載のポリヌクレオチドもしくはその一部に対するアンチセンスDNA。

〔13〕 〔3〕に記載のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、
(a) 〔3〕に記載のタンパク質に被検試料を接触させる工程、および
(b) 該タンパク質に結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

〔14〕 〔13〕に記載の方法により単離されうる、〔3〕に記載のタンパク質に結合する化合物。

〔15〕 〔3〕に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物をスクリーニングする方法であって、
(a) 〔3〕に記載のタンパク質を発現する細胞と、標識した長鎖脂肪酸、および被検試料とを接触させ、インキュベートする工程、
(b) 長鎖脂肪酸の該細胞への取り込み活性を測定する工程、
(c) 被検試料非存在下において測定した場合と比較して、該取り込み活性を制御する化合物を選択する工程、を含む方法。

〔16〕 〔15〕に記載の方法により単離されうる、〔3〕に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物。

本発明におけるアミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:40 3-410, 1990)。BLAST に基づいて BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100, wordlength = 12 とする。また、BLAST に基づいて BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50, wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

本発明は、新規な膜タンパク質 PSEC67 に関する。本発明のタンパク質に含まれる PSEC67 (配列番号 : 2) は、レチノイン酸により分化を誘導したヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞である NT-2 神経前駆細胞から調製された cDNA をスクリーニングすることにより得られた遺伝子がコードする膜タンパク質である。このタンパク質は、脂肪酸輸送活性を持つ新規な膜タンパク質である。従って、本発明のタンパク質やその遺伝子、また、本発明のタンパク質の活性を調節する化合物は、長鎖脂肪酸の代謝に関与する疾患の予防や治療への応用が考えられる。また、本発明の遺伝子や蛋白質の構造や発現レベルの異常を検出することにより、疾患の原因を明らかにすることもできる。

本発明のタンパク質は、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明のタンパク質をコードする DNA を挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したタンパク質を精製することにより調製することが可能である。

一方、天然のタンパク質は、例えば、後述する本発明のタンパク質に対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション(例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M. C., Jackson, R. J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照)などにより本発明のタンパク質を調製することも可能である。

本発明には、配列番号：2に示すアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、付加、挿入および／または他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質が含まれる。「配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が PSEC67 タンパク質と同等の生物学的特性を有していることを意味する。PSEC67 タンパク質が持つ生物学的特性としては、オレイン酸、またはアラキドン酸等の長鎖脂肪酸の取りこみ活性が挙げられる。すなわち本発明のタンパク質は、細胞膜表面に発現し、オレイン酸、またはアラキドン酸に代表される長鎖脂肪酸を細胞内へ輸送する活性を持つ。本発明のタンパク質により、細胞内へ輸送される長鎖脂肪酸としては、前記オレイン酸、アラキドン酸の他に、カプリン酸、ラウリン酸、ミリストン酸、パルミチニ酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エイコサペンタエン酸等の、C=10-26 の脂肪酸を例示することができる。本発明において PSEC67 と機能的に同等なタンパク質は、配列番号：2に示すアミノ酸配列に対して、少なくとも 85% 以上のアミノ酸の同一性を示すことが望ましい。本発明における機能的に同等なタンパク質は、具体的には 90% 以上、

より望ましくは95%以上のアミノ酸配列の同一性を示す。アミノ酸配列の同一性は、BLAST検索アルゴリズムなどによって決定することができる。

タンパク質におけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内である。

PSEC67と機能的に同等なタンパク質は、当業者であれば、例えば、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 8.1-8.5）を利用して調製することができる。また、このようなタンパク質は、自然界におけるアミノ酸の変異により生じることもある。

細胞膜タンパク質が持つ脂肪酸を細胞内に輸送する活性は、公知の方法によって確認できる。具体的には、活性を確認すべきタンパク質を発現した細胞を、脂肪酸の存在下で培養し、細胞への脂肪酸の取りこみを観察することによりその活性を確認することができる。脂肪酸の取りこみは、脂肪酸を放射性同位元素(RI)等で標識しておくことによって観察することができる。取りこみを観察するための脂肪酸としては、オレイン酸、またはアラキドン酸等が用いられる。あるいは、これら以外の脂肪酸であっても、PSEC67によって取りこみが確認された脂肪酸であれば、任意の脂肪酸を用いることができる。PSEC67による脂肪酸の取りこみは、被検脂肪酸の存在下でPSEC67の発現細胞を培養し、この細胞による被検脂肪酸の取りこみを観察することにより確認することができる。より具体的には、下記の方法を例示することができる。

- (1) 本発明のタンパク質を発現した細胞をチャコール処理された血清存在下で培養する。
- (2) 放射性同位元素で標識された脂肪酸とBSAとの会合体を作製する。

(3) その会合体を細胞に添加して取り込まれる脂肪酸を検出する。

また、PSEC67 と機能的に同等なタンパク質は、当業者に周知のハイブリダイゼーション技術、あるいは遺伝子增幅技術を利用して単離することも可能である。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術(*Current Protocols in Molecular Biology* edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 6.3-6.4) を用いて PSEC67 をコードする DNA 配列 (配列番号 : 1) またはその一部をもとにこれと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA からこれらタンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることは、通常行いうことである。このように PSEC67 をコードする DNA とハイブリダイズする DNA にコードされるタンパク質であって、これらタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。

機能的に同等なタンパク質を単離する生物としては、ヒト以外に、例えばラット、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションのストリンジエンシーは、通常「1xSSC、0.1% SDS、37°C」程度であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42°C」程度であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65°C」程度であり、ハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有する DNA の単離を期待しうる。但し、上記 SSC、SDS および温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジエンシーを実現することが可能である。

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるタンパク質は、通常、PSEC67 とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、

少なくとも 85% 以上、好ましくは 90% 以上、さらに好ましくは 95% 以上の配列の同一性を指す。

その他、遺伝子増幅技術(PCR) (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons Section 6.1-6.4) を用いて PSEC67 をコードする DNA 配列（配列番号：1）の一部をもとにプライマーを設計し、PSEC67 をコードする DNA 配列またはその一部と相同性の高い DNA 断片を単離して、これをもとに PSEC67 タンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも可能である。

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを含む。この部分ペプチドには、例えば、シグナルペプチドが除去されたタンパク質が含まれる。さらに、抗体調製のための抗原ペプチドが含まれる。部分ペプチドが本発明のタンパク質に特異的であるためには、少なくとも 7 アミノ酸、好ましくは 8 アミノ酸以上、より好ましくは 9 アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、本発明のタンパク質に対する抗体や本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製以外に、例えば、本発明のタンパク質に結合する受容体のスクリーニングなどに利用し得る。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造する。

更に、本発明は、上記本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。本発明のポリヌクレオチドとしては、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、その形態に特に制限はなく、cDNA の他、ゲノム DNA、化学合成 DNA、RNA なども含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。更に本発明のポリヌクレオチドは、他の蛋白質やオリゴペプチドをコードするポリヌクレオチドと融合したものであることができる。本発明のポリヌクレオチドは、上記のように、PSEC67 をコードする塩基配列（配列番号：1）もしくはその一

部をプローブとしたハイブリダイゼーション法やこれら塩基配列をもとに合成したプライマーを用いた PCR 法等の常法により単離することが可能である。

また、本発明は、本発明のポリヌクレオチドが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、挿入したポリヌクレオチドを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしては pBluescript ベクター (Stratagene 社製) などが好ましい。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でタンパク質を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であれば pBEST ベクター (プロメガ社製)、大腸菌であれば pET ベクター (Invitrogen 社製)、培養細胞であれば pME18S-FL3 ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であれば pME18S ベクター (Mol Cell Biol. 8:466~472, 1988) などが好ましい。ベクターへの本発明のポリヌクレオチドの挿入は常法により制限酵素サイトを用いたリガーゼ反応により行うことができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11)。

加えて本発明は、本発明のベクターを保持する形質転換体に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。タンパク質を高発現させるための真核細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞などを例示することができる。

宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 9.1~9.9)、リポフェクタミン法 (G BICO-BRL 社製)、マイクロインジェクション法などの方法で行うことが可能である。

また、本発明は、配列番号：1に記載のポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、本明細書に記載したアルゴリズムにより決定することができる。このようなポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のポリヌクレオチドが用いられる。

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質の異常を検査・診断するために利用できる。例えば、本発明のポリヌクレオチドをプローブやプライマーとして用いたノーザンハイブリダイゼーションやRT-PCRにより、発現異常を検査したり、本発明のポリヌクレオチドをプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により、ゲノムDNA-PCRやRT-PCRにより本発明のタンパク質をコードするDNAやその発現制御領域を増幅し、RFLP解析、SSCP、シークエンシング等の方法により、配列の異常を検査・診断することができる。

本発明において、「配列番号：1に記載のポリヌクレオチドと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するポリヌクレオチド」には、本発明のタンパク質の発現を抑制するためのアンチセンスDNAが含まれる。アンチセンスDNAは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp、さらに好ましくは500bp以上の鎖長を有し、通常、30

00bp 以内、好ましくは 2000bp 以内の鎖長を有する。このようなアンチセンス DNA には、本発明のタンパク質の異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患（特に、長鎖脂肪酸の代謝に関連した疾患）の遺伝子治療への応用も考えられる。該アンチセンス DNA は、例えば、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号：1 に記載の DNA）の配列情報を基にホスホロチオエート法(Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21, 1988)などにより調製することが可能である。

本発明のポリヌクレオチドまたはアンチセンス DNA は、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ隨伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどをを利用して、*ex vivo* 法や *in vivo* 法などにより患者へ投与を行う。

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には特に制限はなく、ポリクローナル抗体やモノクローナル抗体または抗原結合性を有するそれらの一部も含まれる。また、全てのクラスの抗体が含まれる。さらに、本発明の抗体には、ヒト化抗体などの特殊抗体も含まれる。

本発明の抗体は、ポリクローナル抗体の場合には、常法に従いアミノ酸配列に相当するオリゴペプチドを合成して家兎に免疫することにより得ることが可能であり (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12~11.13) 、一方、モノクローナル抗体の場合には、常法に従い大腸菌で発現し精製したタンパク質を用いてマウスを免疫し、脾臓細胞と骨髄腫細胞を細胞融合させたハイブリドーマ細胞の中から得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al., 1987: Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4~11.11) 。

本発明のタンパク質に結合する抗体は、本発明のタンパク質の精製に加え、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常の検査・診断に利用することも

考えられる。具体的には、例えば組織、血液、または細胞などからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法による本発明のタンパク質の検出を通して、発現や構造の異常の有無を検査・診断することができる。

また、本発明のタンパク質に結合する抗体を、本発明のタンパク質に関連した疾患の治療などの目的に利用することも考えられる。抗体を患者の治療目的で用いる場合には、ヒト抗体またはヒト化抗体が免疫原性の少ない点で好ましい。ヒト抗体は、免疫系をヒトのものに入れ換えたマウス（例えば、「Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice, Mendez, M. J. et al. Nat. Genet. 15: 146-156, 1997」参照）に免疫することにより調製することができる。また、ヒト化抗体は、モノクローナル抗体の超可変領域を用いた遺伝子組み換えによって調製することができる(Methods in Enzymology 203, 99-121, 1991)。

また、本発明は、本発明のタンパク質を利用した、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。

該スクリーニング方法により、選択される化合物は、本発明のタンパク質による細胞への脂肪酸取り込み活性を制御する働きが期待される。

具体的な方法としては、例えば、本発明のタンパク質のアフィニティーカラムに被検試料を接触させ精製する方法、twoハイブリッドシステムを利用する方法、ウエストウエスタンブロッティング法、コンビナトリアルケミストリー技術におけるハイスループットスクリーニングによる方法など多くの公知の方法を利用すことができる。

スクリーニングに用いる被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられる。

標識としては、¹²⁵IなどのRI標識のほか、酵素（アルカリホスファターゼ等）標識も可能である。また、本発明のタンパク質を標識せずに用いて、本発明のタンパク質に対する抗体を標識して用いて検出することも考えられる。

また、本発明の膜タンパク質による長鎖脂肪酸の細胞内への取り込み活性を指標として、該取り込み活性を制御する化合物のスクリーニングを行うことができる。

このスクリーニング方法は、(a) 本発明のタンパク質を発現する細胞と、標識した長鎖脂肪酸、および被検試料とを接触させ、インキュベートする工程、(b) 長鎖脂肪酸の該細胞への取り込み活性を測定する工程、および(c) 被検試料非存在下において測定した場合と比較して、該取り込み活性を制御する化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、天然化合物などが挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明のタンパク質との結合活性を指標としたスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。

スクリーニングに使用する長鎖脂肪酸としては、オレイン酸、アラキドン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、エイコサペンタエン酸等を挙げることができる。特に、オレイン酸、またはアラキドン酸を好適に使用することができる。その他、PSEC67による取りこみ活性を確認された脂肪酸は、いずれも本発明によるスクリーニング方法に用いることができる。

上記長鎖脂肪酸の標識としては、上記の RI 標識等が挙げられる。上記取り込み活性の測定は、RI 標識の場合、細胞中の放射活性をシンチレーションカウンター等で計測することにより行うことができる。計測した値が、被検試料が存在しない場合と比較して有意に高い場合、取り込み活性を促進すると判定する。反対に、計測した値が、被検試料が存在しない場合と比較して有意に低い場合、取り込み活性を阻害すると判定する。

上記の方法によりスクリーニングされた化合物、特に脂肪酸の取り込みを促進する化合物は、糖尿病、動脈硬化に対する治療効果が期待できる。一方、脂肪酸の取り込みを阻害する化合物は、抗肥満薬として治療効果が期待できる。また、本発明のタンパク質が関連する疾患（例えば、糖尿病、動脈硬化、肥満等代謝性疾患、心筋症、骨格筋障害、腎障害等）の予防薬または治療薬への応用を考えられる。

本発明のスクリーニング方法により単離された化合物を医薬品として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行い、投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物が DNA によりコードされうるものであれば、該 DNA を遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。また本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、293 細胞における PSEC67 タンパク質の発現を示す写真。

図 2 は、一過的発現細胞におけるオレイン酸の取り込みを示す図。縦軸は Mock transfection の細胞の場合と比較したオレイン酸の取り込み比率を表す。

図 3 は、持続的発現細胞におけるオレイン酸の取り込みを示す図。横軸の数字はクローン番号を、縦軸は Mock クローンに対する脂肪酸の取り込み度（倍）を表す。

図 4 は、RT-PCR による PSEC67 の組織分布を示す写真。

図 5 は、オレイン酸、またはアラキドン酸の取り込みを示す図。縦軸は Mock transfection の細胞におけるバッファーを 1 としたときの比率を示す。（A）は、オレイン酸、（B）はアラキドン酸の場合を表す。

図 6 は、本発明の PSEC67 と、マウス FATP-3 をコードする cDNA の塩基配列を比較した結果を示す図である。

図 7 は、本発明の PSEC67 と、マウス FATP-3 をコードする cDNA の塩基配列を比較した結果を示す図である。

図 8 は、本発明の PSEC67 と、マウス FATP-3 をコードする cDNA の塩基配列を比較した結果を示す図である。

図 9 は、本発明の PSEC67 と、マウス FATP-3 のアミノ酸配列を比較した結果を示す図である。

図 10 は、本発明の PSEC67（上段）と、ヒトのアシル CoA 合成酵素（下段）のアミノ酸配列のアライメントを示す図である。アンダーラインで示した YIFTS GTTGLPK が ATP 結合領域を、また FHDRTGDTFRWKGENVATTEVA が FATP 保存領域を示す。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[実施例 1] PSEC67 の単離

ヒト胎児精巣由来のテラトカルシノーマ細胞でレチノイン酸処理により神経細胞に分化可能な NT-2 神経前駆細胞 (Stratagene 社より購入) を用いて、cDNA ライブラリーを作製した。まず添付マニュアルに従って、NT-2 細胞をレチノイン酸処理して培養し、培養細胞を集めて、文献 (J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis, Molecular Cloning Second edition, Cold Spring harbor Laboratory Press 1989) 記載の方法により mRNA を抽出した。さらに、オリゴ dT セルロースで poly(A)⁺RNA を精製した。

poly(A)⁺RNA よりオリゴキャップ法 [M. Maruyama and S. Sugano, Gene, 138: 171-174 (1994)]により cDNA ライブラリーを作成した。Oligo-cap linker (aggcaucgagu cggccuuguu ggccuacugg／配列番号：3) およびオリゴ dT プライマー (gcggctgaag acggcctatg tggcctttt ttttttttt tt／配列番号：4) を用いて文献 [鈴木・菅野, 蛋白質 核酸 酵素, 41: 197-201 (1996)、Y. Suzuki et al., Gene, 200: 149-156 (1997)] の記載にしたがって BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) 処理、TAP (Tobacco Acid Phosphatase) 処理、RNA ライゲーション、第一鎖 cDNA の合成と RNA の除去を行った。次いで、5' (agcatcgagt cggccttgtt g／配列番号：5) と 3' (gcggctgaag acggcctatg t／配列番号：6) の PCR プライマーを用い PCR (polymerase chain reaction) により 2 本鎖 cDNA に変換し、Sfi I 切断した。次いで、DraIII で切断したベクター pME18SFL3 に cDNA の方向性を決めてクローニングし、cDNA ライブラリーを作成した。これらより得たクローニングのプラスミド DNA について、挿入 cDNA サイズが 1 kb 以下のクローンを除いた後、cDNA の 5' 端と 3' 端の塩基配列を DNA シーケンシング試薬 (Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit, dRhodamine Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit または BigDye Terminator Cycle Sequencing F

S Ready Reaction Kit, PE Biosystems 社製) を用い、マニュアルに従ってシー ケンシング反応後、DNA シーケンサー (ABI PRISM 377, PE Biosystems 社製) で DNA 塩基配列を解析した。

オリゴキャップ法で作製したライブラリーの cDNA の 5'-末端の全長率を次の 方法で、求めた。公共データベース中のヒト既知 mRNA と 5'-末端配列が一致す る全クローンについて、公共データベース中の既知 mRNA 配列より長く 5'-末端 が伸びている場合と 5'-末端は短いが翻訳開始コドンは有している場合を「全 長」と判断し、翻訳開始コドンを含んでいない場合を「非全長」と判断した。各 ライブラリーでの cDNA クローンの 5'-末端の全長率 [全長クローン数 / (全長 クローン数 + 非全長クローン数)] をヒト既知 mRNA と比較することにより求め た。その結果、このライブラリーの全長率は 6.2% であり、5'-端配列の全長率が 非常に高いことが分かった。

次に、ATGpr と ESTiMateFL を用いて、cDNA の 5'-末端の全長率を評価した。

ATGpr は、ATG コドンの周辺の配列の特徴から翻訳開始コドンであるかどうか を予測するためにヘリックス研究所の A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Sw indells により開発されたプログラムである [A. A. Salamov, T. Nishikawa, M. B. Swindells, Bioinformatics, 14: 384-390 (1998); <http://www.hri.co.jp/atgpr/>]。結果は、その ATG が真の開始コドンである期待値で表した (0.05-0.9 4)。その結果、PSEC67 の ATGpr1 値は、0.26 であった。

ESTiMateFL は、公共データベース中の EST の 5'-末端配列や 3'-末端配列との 比較による全長 cDNA の可能性の高いクローンを選択するヘリックス研究所の西 川・太田らにより開発された方法である。

この方法は、ある cDNA クローンの 5'-末端や 3'-末端配列よりも、長く伸びた EST が存在する場合には、そのクローンは「全長ではない可能性が高い」と判断 する方法で、大量処理可能なようにシステム化したものである。公共データベー ス中の EST 配列より長く 5'-末端が伸びている場合、および 5'-末端が短いクロ

ーンでも両者の差が 50 塩基以内である場合を便宜的に全長とし、それ以上短い場合を非全長とした。EST との比較による完全長らしさの評価では、比較対照とする EST の数が多ければ予測精度は高まるが、対象 EST が少ない場合には予測結果の信頼性が低くなる欠点はある。この方法は、5'-末端配列での全長率が約 60% のオリゴキャップ法による cDNA クローンから全長ではない可能性の高いクローンを排除するのに使えば有効である。また、ESTiMateFL は、公共データベースへの EST 登録が適當数あるヒト未知 mRNA の cDNA の 3'-末端配列の全長性を評価するには、特に有効な方法である。

その結果、PSEC67 は、全長 cDNA であることが予測された。

次に、オリゴキャップ法で作成したライブラリーのクローンから、5'-末端配列の中のすべての ATG コドンから予測される推定アミノ酸配列について、中井・金久が開発した蛋白質の局在性予測プログラム「PSORT」[K. Nakai & M. Kanehisa, Genomics, 14: 897-911 (1992)]を用い、多くの分泌蛋白質のアミノ末端に特徴的なシグナルペプチドと予測される配列の有無を解析することにより、シグナル配列をもつと予測されるクローン（分泌蛋白質、または膜蛋白質の可能性が高い）を特異的に選別した。

更にこうして選択したクローンについて、全長 cDNA の塩基配列、並びに推定アミノ酸配列を決定した。塩基配列は、次に示す 3 種の方法を組み合わせ、各方法によって決定した塩基配列を完全にオーバーラップさせ、最終的な確定塩基配列を決定した。

(1) Licor DNA シーケンサーを用いた cDNA 挿入断片両末端からのロングリードシーケンス (Licor シーケンサー (アロカ社販売) のマニュアルに従ってシークエンシング反応後、Licor シーケンサーで DNA 塩基配列を解析した)、

(2) AT2 トランスポゾン試験管内転移を用いた Primer Island 法によるネストッドシーケンス [S. E. Devine and J. D. Boeke, Nucleic Acids Res., 22: 3765-3772, (1994)] (PE Biosystems 社製のキットとマニュアルにしたがってクロ

ーンを取得後、PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

(3) カスタム合成 DNA プライマーを用いたダイデオキシターミネーター法によるプライマーウォーキング (カスタム合成 DNA プライマーをもち PE Biosystems 社製の DNA シーケンシング試薬でマニュアルに従ってシーケンシング反応し、ABI PRISM 377 で DNA 塩基配列を解析した)

これらの配列について、ATGpr と PSORT による解析および GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析を行った。ほとんどのクローンが N-末端にシグナル配列をもつ分泌タンパク質、または膜タンパク質であると推定された。さらに、PSEC67 をはじめとする、PSORT でシグナル配列が検出されなかったクローンについては、MEMSAT [D. T. Jones, W. R. Taylor & J. M. Thornton, Biochemistry, 33: 3038-3049 (1994)] および SOSUI [T. Hirokawa et al. Bioinformatics, 14, 378-379 (1998)] (三井情報開発株式会社販売) で膜タンパク質 (transmembrane helix をもつ) と予測できるかどうかを検索した。その結果、PSEC67 には transmembrane helix が存在すると予測され、膜タンパク質であると推定された。したがって PSEC67 は、N-末端にシグナル配列は存在しないが膜タンパク質であり、全長 cDNA クローンであると考えられた。また、GenBank や SwissProt に対する BLAST 解析の結果、PSEC67 がマウス Fatty Acid Transport Protein-3(FATP-3) と塩基レベルで 83%、そしてアミノ酸レベルで 83% のホモロジーを有する新規なタンパク質をコードしていることが明らかとなった。

また PSEC67 はその一次構造において、ATP 結合領域、およびその C 末端側に FATP に保存される領域を有する。またその領域はいずれも Acyl-CoA Synthetase の一次構造においても保存されている (図 10)。このことから、PSEC67 は Acyl-CoA Synthetase 活性も併せもつことが予想される。この活性は、Jae-Yeon Choi らの方法 (Jae-Yeon Choi, J.B.C., 274, 4671-4688, 1999) に準じた方法に

より確認される。以上の結果を、次に示す。クローン名の後ろに//で区切って次のデータを記載した。

クローン名(PSEC番号)//

配列名//

cDNAのサイズ(bp)//

推定アミノ酸配列の構成アミノ酸数(a.a.)//

N末端から数えたATGの数//

最大ATGpr1値//

シグナル配列の有無及び、MEMSAT、SOSUIでの膜蛋白予測の結果//

アノテーション

PSEC67 // C-NT2RP2001142 // 2405 // 730 // 1 // 0.26 // No & transmembrane // 1462/1751 (83%) similarity to mouse fatty acid transport protein-3

PSEC67 // C-NT2RP2001142 // 2405 // 730 // 1 // 0.26 // No & transmembrane // 935/1603 (58%) similarity to human very-long-chain acyl-CoA synt hase (VLCS)

[実施例2] 発現プラスミド「pcDNA 3.1(-) - PSEC67」の構築

PSEC67のコーディング領域をpcDNA3.1(-)に連結した。まずプライマーを次のように設計した。

Primer 1; 5'- GGAATTCCGTGGAGTGGTGGGGCCTGGTGGAAAT (配列番号: 7)

Primer 2; 5'- CGGGATCCCACCTGCAACGGCCCCACCCCCACAGAGTTTC -3' (配列番号: 8)

pME18SFL3-PSEC67をテンプレートとし、LA taq polymerase(Takara)を用いてPCR法によりフラグメントを増幅した。このcDNAフラグメントとベクターpcDNA 3.1 (-) (INVITROGEN)をそれぞれBamHI、EcoRIで処理した後、それをアガロースゲル電気泳動により精製し、Takara Ligation kit ver. 2を用いて連結した。

これを *E. coli* DH5 alpha に導入して、発現用プラスミドを得た。このプラスミドを用いて塩基配列の確認を行った。

〔実施例3〕 発現確認用プラスミド「pcDNA 3.1(-)/MycHis - PSEC67」の構築
PSEC67 の coding region を pcDNA 3.1(-) / MycHis-A に連結した。まずプライマーを次のように設計した。

Primer 1; 5'- GGAATTCCGTGGAGTGGTGGGGGCCTGGGTGGGAAT (配列番号：9)

Primer 3; 5'- CGGGATCCGATTCGAAGGTTCTGCCAG -3' (配列番号：10)

次に、pME18SFL3-PSEC67 をテンプレートとし、LA taq polymerase(Takara)を用いて PCR 法によりフラグメントを増幅した。この cDNA フラグメントとベクターである pcDNA3.1 (-) / MycHis-A(INVITROGEN)をそれぞれ BamHI、EcoRI で酵素処理した後、それぞれをアガロースゲル電気泳動により精製し、Takara Ligation kit ver. 2 を用いて連結した。これを *E. coli* DH5 alpha に導入して、MycHis タグ付きの発現確認用プラスミドを得た。これを用いて塩基配列の確認を行った。

〔実施例4〕 発現の確認

(1) プラスミドの導入

発現用プラスミドをリン酸カルシウム法、またはリポフェクタミン等を用いたその他の方法により、COS-7 細胞、293 細胞等の動物細胞に導入した。

COS-7 細胞のリン酸カルシウム法は以下のように行った。

まず1日目に 10cm 径シャーレに細胞を 1,000,000 cells/dish になるよう調製し、培地 20 ml 中、37℃で 20 時間培養を続けた。10 μg の発現プラスミドを、983 μl の 0.1 x TE に溶解し、さらに 142 μl の CaCl₂ 溶液を加えて混合し、氷中で冷却した。別のチューブに氷冷した 1.125 ml の 2 x HBS を用意し、先に混合した DNA 液 1.125 ml を混合した。2.25 ml ずつをシャーレに加えよく混合した後、37℃で 6 時間保温し、グリセロールショックの操作を行った。すなわち、5

ml の TBS で 2 回洗浄後、5 ml の TBS-20% グリセロールで細胞を洗浄した。さらに 5 ml の TBS で細胞を 2 回洗浄、5 ml の PBS(-) で細胞を 1 回洗浄後、10 ml の培地を加えて 37°C で 20 時間培養した。培地を新しいものに換えた後さらに 37°C、5% CO₂ で培養した。なお、293 細胞については、グリセロールショックの操作を省き、次の日に培地を交換した。導入して 3 日目に、培養上清と細胞を得た。使用した溶液の組成は以下の通りである。

・ 2 x HBS :

HEPES 5.96g

NaCl 8.18g

0.1M Na₂HPO₄ 7.5 ml / 500 ml 水 (pH 7.12)

・ TBS (1Lあたり) :

NaCl 8g

KCl 0.38g

Na₂HPO₄/12H₂O 0.2g

Tris-Cl 3g

CaCl₂/2H₂O 0.114g

MgCl₂/6H₂O 0.115g

(2) サンプルの調製

細胞は PBS(-) バッファーで 2 回洗浄後、遠心 (500 x g) により集めた。これに 200 μl の homogenizing buffer (20 mM Tris-Cl、1mM A-PMSF) を加え、溶融解(freeze-thaw) を 3 回繰り返した後テフロンホモジナイザーを用いて氷中 10 往復させて細胞を破碎した。これを 1000 x g で残渣を遠心分離して上清画分を細胞画分とした。培養上清画分は培養後の培地をそのまま、または分子量 10,000 カットのメンブレンフィルター (CENTRICON; AMICON) を用いて濃縮したサンプルを用意した。細胞画分、及び培養上清画分のサンプルをそれぞれ 8 μl 用いて

ウエスタンプロット法により発現を確認した。なお、細胞画分 8 μ l はタンパク質量として約 15 μ g に相当する。ウエスタンプロットは以下のように行った。

(3) タンパク質の検出（ウエスタンプロッティング）

サンプル 8 μ l に 5 x loading buffer を 2 μ l 加え、100°Cで 5 分間反応させて変性させた後氷中にて 2 分間冷却した。これを SDS-PAGE (PAGEL, ATTO Corporation) に付し、20mA で約 1 時間電気泳動を行った。終了後、ゲルをプロッティングバッファー中で約 20 分間平衡化させた後、同 buffer で約 10 分間平衡化した PVDF メンブレンにゲル中のタンパク質を TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO RAD) を用いて電気的にトランスファーした。

・プロッティングバッファー (1L 中) :

3g Tris-base

14.4g グリシン

20% エタノール

タンパク質をトランスファーした PVDF メンブレンをブロックエース（大日本製薬）で室温中 2 時間、または 4°Cで一晩ブロッキングした後、一次抗体 (anti-myc antibody, INVITROGEN) を 1 時間反応させた。メンブレンを洗浄後、二次抗体 (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (Jackson Immuno Research) を室温で 1 時間反応させた。さらにメンブレンを洗浄後、ECL Western blotting detection reagents (Pharmacia) を用いてタンパク質を検出した。

その結果、PSEC67 を導入した細胞の細胞画分に約 70Kda のタンパク質のバンドが検出された。培養上清画分、及び Mock transfection (293 細胞にベクターのみを導入したもの) の細胞画分、培養上清画分のサンプルはこのバンドが検出されなかった。従って、細胞画分での PSEC67 タンパク質の発現が確認された(図 1)。

〔実施例 5〕 オレイン酸の取り込み活性の測定

脂肪酸の取り込みの活性を見るために、 [¹⁴C] ラベルしたオレイン酸の組換え細胞内への取り込みについて検討した。上記のように 15 cm 径シャーレ中で 293 細胞にリン酸カルシウム法、 またはリポフェクトアミンを用いてプラスミドを導入し、 翌日に培地を交換した。 アッセイの前日に培地を 10% 脂肪酸無添加 CS を含む D-MEM(antibiotics -) に交換して 1 日培養した。 アッセイ当日にまずアルブミン結合脂肪酸(Albumin-bounded fatty acid)を作製した。 40°C に保温したミリQ水 100 μl に [¹⁴C]-オレイン酸 10 μl を加え軽く攪拌した後、 脂肪酸不含 BSA 溶液 (prepared from fr. V, SIGMA, 20 g / 100 ml) を最終モル比が 1:1 になるように加え、 緩やかに攪拌した。 それに 2 倍量の PBS(-) を添加し、 37°C で 45 分間反応させた。 細胞の培養上清を吸い取り、 細胞を 5 ml の PBS(-) で 2 回洗浄後、 PBS(-) を 5 ml シャーレに加え、 セルスクレイパーで細胞を搔き取りチューブに移した。 遠心して細胞を集めた後、 5 × 10⁵ cells / ml になるように PBS(-) を添加した。 その後、 細胞懸濁液を 200 μl ずつ氷中の 15 ml 容ポリプロピレンチューブに移した。 細胞懸濁液を 37°C で 5 分間プレインキュベートした後、 50 μl のアルブミン結合脂肪酸([¹⁴C]-オレイン酸アルブミン結合溶液)を各チューブに加えて 37°C で 3 分間反応させた。 反応後予め氷冷した Stop solution (=Washing solution; 0.1 % BSA(脂肪酸不含)、 200 μM phloretin in PBS (-)) 5 ml を各チューブに加えて反応を止めた後、 saturate buffer (0.1 % BSA (脂肪酸不含) in PBS(-)) 中で一晩サチュレートさせた GF/C グラスフィルターで細胞を濾過後、 5 ml の Washing solution で 3 回細胞を洗浄した。 その後、 このグラスフィルターを 10 ml のクリアゾル I を入れた液体シンチレーション用バイアル中で一晩ソーカーした後、 カウントを測定した。

その結果、 PSEC67 を一過的に導入した細胞は、 Mock transfection の細胞に比べてオレイン酸の取り込みを有意に増加させた(図 2)。 コントロールとして rat FATP-1 を導入した細胞もオレイン酸の取り込みを増加させた。 293 細胞にベクターのみを導入したもの(Mock transfection) もオレイン酸の取り込みを上昇さ

せたが、これはホスト細胞である 293 が腎臓由来の細胞であり、脂肪酸輸送タンパク質(Fatty acid transport protein)をもともと若干発現しているためと考えられる。

また、G-418 で高発現しているクローンを選択することによって、PSEC67 を持続的に発現する組換え細胞株を樹立し、それについてもオレイン酸の取り込みを検討したところ、Mock クローンに対して有意にその取り込みを上昇させた（図 3）。

〔実施例 6〕組織分布の検討

PCR 法により PSEC67 のヒト正常組織における組織分布を検討した。ヒト正常組織 cDNA は、Multiple Tissue cDNA Panel (CLONTECH) を用いた。La taq polymerase (宝酒造) を用いて PCR 法を実施した。プライマーは以下のプライマーを用いた。

5'-oligo; 5' - AACAGGGCTGCACGCGCCTT -3' (配列番号: 1 1)

3'-oligo; 5' - CGGGATCCCACCTGCAACGGCCCC CACCCCACAGAGTTC -3' (配列番号: 1 2)

PCR のサイクル数は 25、30、35 回を行い、バンドの濃度が飽和に達していないサイクル数（30 サイクル）の結果に基づいて発現を判定した。

PCR 法により組織分布を検討した結果、前立腺、小腸、胎盤、精巣、脾臓、末梢血、脾臓、肝臓等の組織で発現していることが確認された。また脳、心臓、腎臓、大腸でも若干の発現がみられた（図 4）。これらのことから、本発明のタンパク質 PSEC67 は、各組織から脂肪酸を取り入れて最終的にエネルギーを各組織細胞に与える働きをすると考えられるほか、小腸からの脂肪酸の取り込みに関与するものと考えられる。また免疫系に関与する可能性も示唆される。

〔実施例 7〕PSEC67 の脂肪酸選択性の検討

PSEC67 の長鎖脂肪酸選択性を以下のようにして検討した。つまり実施例 4において、放射性同位元素標識した長鎖脂肪酸について BSA 結合脂肪酸を作製する

のと同時に、cold 脂肪酸についても BSA 結合脂肪酸を作製した。すなわち放射性同位元素標識した長鎖脂肪酸の 20 倍濃度の cold 長鎖脂肪酸を用意し、それに脂肪酸無添加 BSA を最終モル比がオレイン酸の場合 1:1、アラキドン酸の場合 1:10 になるように加え、穏やかに攪拌後、2 倍量の PBS(-) を添加し、37℃で 45 分間反応させた。

準備した細胞懸濁液を 37℃で 5 分間プレインキュベートした後、cold 脂肪酸／BSA 溶液を 50 μl 加え、さらに 3 分間 37℃にてインキュベートした。その後、放射性同位元素標識したアルブミン結合脂肪酸を 50 μl 加えて 3 分間反応させた。反応後、予め氷冷した stop solution (=Washing solution; 1% BSA (脂肪酸無添加)、200 μM phloretin in PBS(-) 5ml) を各チューブに加えて反応を停止した。以降の手順は、実施例 4 と同様にして行った。

その結果を図 5 に示す。PSEC67 を導入した細胞は、Mock transfection の細胞に比べてオレイン酸、アラキドン酸ともその取り込みを有意に増加させた。またそれらの取り込みは、cold のオレイン酸により有意に抑制された。しかし同様にトランスポーターを介して細胞内に輸送されるグルコースはそれらの取り込みを抑制しなかった。以上のことから、本発明のタンパク質はオレイン酸、アラキドン酸等の長鎖脂肪酸の輸送に対して選択性を示すことが分かった。また、長鎖脂肪酸間での選択性が無い、もしくはあっても弱いものと考えられた。

産業上の利用の可能性

本発明により長鎖脂肪酸の代謝、特に細胞への長鎖脂肪酸の取り込みに関与する新規な膜タンパク質、および該タンパク質をコードする遺伝子が提供された。本発明のタンパク質や該タンパク質をコードする遺伝子、および該取り込み活性を制御する化合物は、長鎖脂肪酸の代謝異常に伴う種々の疾患（糖尿病、動脈硬化、肥満等代謝性疾患、心筋症、骨格筋障害、腎障害等）に対する、予防もしくは治療薬への利用が期待される。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号 : 1 に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号 : 1 に記載された塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、配列番号 : 2 に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

2. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド。

3. 請求項 1、または請求項 2 に記載のポリヌクレオチドによってコードされる蛋白質。

4. 請求項 1、または請求項 2 に記載のポリヌクレオチドが挿入されたベクター。

5. 請求項 1、もしくは請求項 2 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 4 に記載のベクターを保持する形質転換体。

6. 請求項 5 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 3 に記載の蛋白質の製造方法。

7. 請求項 3 に記載の蛋白質に対する抗体。

8. 請求項 7 に記載の抗体と、請求項 3 に記載の蛋白質との免疫学的反応を検出する工程を含む、請求項 3 に記載の蛋白質の免疫学的測定方法。
9. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドのいずれか、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドであって、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を持つポリヌクレオチド。
10. 請求項 9 に記載のポリヌクレオチドからなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチド合成用プライマー。
11. 請求項 9 に記載のポリヌクレオチドからなる、請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの検出用プローブ。
12. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドもしくはその一部に対するアンチセンス DNA。
13. 請求項 3 に記載のタンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) 請求項 3 に記載のタンパク質に被検試料を接触させる工程、および
 - (b) 該タンパク質に結合する化合物を選択する工程、を含む方法。
14. 請求項 13 に記載の方法により単離されうる、請求項 3 に記載のタンパク質に結合する化合物。
15. 請求項 3 に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物をスクリーニングする方法であって、
 - (a) 請求項 3 に記載のタンパク質を発現する細胞と、標識した長鎖脂肪酸、および被検試料とを接触させ、インキュベートする工程、
 - (b) 長鎖脂肪酸の該細胞への取り込み活性を測定する工程、
 - (c) 被検試料非存在下において測定した場合と比較して、該取り込み活性を制御する化合物を選択する工程、を含む方法。
16. 請求項 15 に記載の方法により単離されうる、請求項 3 に記載のタンパク質を発現する細胞への長鎖脂肪酸の取り込みを制御する化合物。

THIS PAGE BLANK (USPTO)